



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 15/55, 15/82, C12P 7/64, A01H 5/00, 5/10		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/03511
			(43) Date de publication internationale: 8 février 1996 (08.02.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00957 (22) Date de dépôt international: 18 juillet 1995 (18.07.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/09272                      25 juillet 1994 (25.07.94)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE (I.N.P.T.) [FR/FR]; Place des Hauts-Murats, F-31000 Toulouse (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ALIBERT, Gilbert [FR/FR]; 14, place André-Maurel, F-31320 Castanet (FR). MOULOUNGUI, Zéphirin [FR/FR]; Appartement 861, 4, rue d'Arles, F-31500 Toulouse (FR). BOUDET, Alain [FR/FR]; 18, rue Caubert, F-31400 Toulouse (FR). (74) Mandataire: BARRE, Philippe; Cabinet Barre Laforgue & Associés, 95, rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).		(81) Etats désignés: AU, BG, CA, CN, HU, JP, NZ, PL, RO, RU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FATTY ACIDS OR DERIVATIVES THEREOF FROM OIL PLANTS (54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS OU DERIVES A PARTIR DE PLANTES OLEAGINEUSES (57) Abstract <p>A method for producing fatty acids or derivatives thereof from oil plants by producing transgenic oil plants that have at least one gene coding for a lipase, i.e. a lipase gene, and a promoter combined with the lipase gene and enabling the expression thereof either in compartments other than the lipid accumulation compartments or by exogenous induction, collecting seeds or fruits containing lipids of the plants, crushing them, optionally after inducer processing, to contact the lipids with the lipase, incubating the resulting material to cause enzymatic hydrolysis of the lipids, and extracting the fatty acids or fatty acid derivatives.</p>			
(57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé de production d'acides gras ou de dérivés d'acides gras à partir de plantes oléagineuses. Ce procédé est caractérisé en ce qu'on produit des plantes oléagineuses transgéniques possédant, d'une part, au moins un gène codant pour une enzyme lipase, dit gène de lipase, d'autre part, associé à ce gène de lipase, un promoteur permettant une expression dudit gène soit dans des compartiments différents des compartiments d'accumulation des lipides, soit sur induction exogène, on recueille les graines ou fruits contenant les lipides des plantes, on les broie le cas échéant après traitement inducteur de façon à mettre en contact lipides et lipase, on laisse incuber l'ensemble pour engendrer une hydrolyse enzymatique des lipides et on extrait les acides gras ou dérivés.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bразил	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Беларус	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS OU DERIVES  
A PARTIR DE PLANTES OLEAGINEUSES

L'invention concerne un procédé de  
5 production d'acides gras ou dérivés d'acides gras (esters  
ou autres dérivés) à partir de plantes oléagineuses. Le  
procédé de l'invention s'applique en particulier à des  
plantes oléoprotéagineuses telles que colza, tournesol,  
soja, crambé... L'invention peut notamment être utilisée  
10 pour fabriquer des bio-carburants (diester), lubrifiants,  
adjuvants phytosanitaires, détergents... par transformation  
des acides gras produits.

On a tenté depuis 1970 de substituer aux  
produits dérivés du pétrole (notamment carburants) des  
15 produits obtenus à partir de matière végétale afin de  
réduire la dépendance vis-à-vis des pays producteurs de  
pétrole et d'élargir les débouchés des produits agricoles.  
La filière utilisant les plantes oléagineuses comme matière  
première passe par la production d'acides gras libres qui  
20 constituent la matière première pour les industries de  
transformation vers les carburants, lubrifiants... Les  
lipides accumulés par les plantes oléagineuses peuvent être  
transformés en acide gras par hydrolyse : deux procédés  
sont actuellement exploités industriellement pour opérer  
25 cette transformation.

Un premier procédé consiste à hydrolyser  
les lipides après extraction en mettant en contact à chaud  
et sous pression les lipides extraits avec du méthanol  
sulfurique ou de la potasse méthanolique. Un autre procédé  
30 consiste à opérer l'hydrolyse dans des conditions  
similaires directement sur le broyat de graines sans  
extraction préalable. On pourra par exemple se reporter à  
la référence suivante pour plus de détails sur ces procédés  
qui sont les seuls exploités dans l'industrie pour  
35 hydrolyser les huiles végétales : K.J. Harrington et  
C. d'Arcy-Evans, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 1985, 24,  
314-318. Les défauts bien connus de ces procédés sont les  
suivants : coût de mise en oeuvre élevé, infrastructure

industrielle lourde, caractère polluant des effluents, production de glycérol comme sous-produit sans marché actuellement. Ces procédés sont mis en oeuvre faute de techniques de remplacement.

5 Par ailleurs, des expérimentations ont été conduites en laboratoire pour réaliser l'hydrolyse des lipides par voie enzymatique en mélangeant une lipase avec les lipides extraits des graines (G.P. McNeill et al., JAOCS, Vol. 68 n° 1 janvier 1991, p. 1-5 ; S.M. Kim et J.S. Rhee, JAOCS Vol. 68 n° 7 juillet 1991, p. 499-503 ; C. Gancet, In Heterogeneous Catalysis And Fine Chemicals II 1991, Guisnet Editors, p. 93-104). Toutefois, ces essais sont restés au stade du laboratoire car la technique est incompatible avec une exploitation industrielle en raison  
10 des quantités d'enzyme nécessaires et du coût de celle-ci.

La présente invention se propose de fournir une nouvelle solution au problème de la production d'acide gras à partir de plantes oléagineuses. Elle vise à fournir une solution dont les coûts de mise en oeuvre sont  
20 considérablement abaissés par rapport aux procédés connus (aussi bien procédés chimiques industriels que procédé enzymatique de laboratoire).

Un objectif de l'invention est ainsi de fournir un procédé exploitable sur le plan industriel dans  
25 des conditions douces de température et de pression, qui bénéficie d'une mise en oeuvre simple et non polluante, utilise une infrastructure légère et ne conduit à aucun sous-produit gênant.

Un autre objectif, lié au précédent, est de  
30 permettre de multiplier les installations de production d'acides gras en vue de les rapprocher des lieux de culture des plantes oléagineuses et de réaliser ainsi des économies de transport de la matière première.

A cet effet, le procédé conforme à  
35 l'invention pour la production d'acides gras ou dérivés d'acides gras à partir de plantes oléagineuses se caractérise en ce que :

- on produit des plantes oléagineuses

transgéniques possédant, d'une part, au moins un gène codant pour une enzyme lipase, dit gène de lipase, d'autre part, associé à ce gène de lipase, un promoteur permettant une expression dudit gène soit dans des compartiments  
5 cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides de la plante, soit sur induction exogène,

- on recueille les graines ou fruits contenant les lipides desdites plantes,

10 - on broie lesdites graines ou fruits, le cas échéant après traitement inducteur, de façon à mettre en contact les lipides et la lipase contenue dans lesdites graines ou fruits,

- on laisse incuber l'ensemble pour engendrer une hydrolyse enzymatique des lipides du broyat  
15 sous l'action catalytique de la lipase contenue dans ledit broyat,

- on extrait les acides gras issus de l'hydrolyse ou on les transforme pour obtenir les dérivés  
20 d'acides gras recherchés.

Ainsi le procédé de l'invention est un procédé d'hydrolyse enzymatique qui bénéficie des avantages de ce type de procédé (conditions douces de mise en oeuvre, absence de pollution, installations légères et peu  
25 coûteuses, absence de sous-produits gênants). Dans ce procédé, on amène la plante à produire elle-même l'enzyme nécessaire à la transformation ultérieure des lipides, en évitant que cette enzyme ne vienne prématurément au contact des lipides de façon à écarter tout risque d'auto-  
30 dégradation de la plante avant la récolte. L'hydrolyse est ensuite obtenue sans addition d'enzyme exogène en opérant la mise en contact des lipides et des enzymes produits par la plante. Un tel procédé présente un coût global de mise en oeuvre particulièrement réduit. Les installations de  
35 broyage et d'incubation sont légères et courantes dans le milieu agricole, de sorte que ces opérations peuvent être exécutées sur les sites de récolte des plantes.

La production des plantes transgéniques est

obtenue en réalisant initialement la transformation génétique d'une plante oléagineuse naturelle, en amenant la plante génétiquement transformée à se multiplier par la voie sexuée pour la production de semences transgéniques et  
5 en utilisant ensuite ces semences pour l'obtention de plantes transgéniques descendantes.

La transformation génétique initiale consiste, selon un processus actuellement bien connu, à réaliser une cassette d'expression comprenant le gène de  
10 lipase et le promoteur d'expression de ce gène et à introduire cette cassette d'expression dans le génome de la plante.

Une des caractéristiques essentielles du procédé de l'invention est que le promoteur associé au gène  
15 de lipase est adapté pour éviter une mise en contact prématurée de l'enzyme et des lipides ; ce promoteur peut être de plusieurs types : il peut soit (1) diriger l'expression du gène dans des compartiments différents de ceux où s'accumulent les lipides, soit (2) initier  
20 l'expression du gène au moment opportun par induction exogène.

Dans le premier cas, deux types de cassettes d'expression peuvent être utilisés :

(1A) soit une cassette d'expression  
25 comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlant l'expression de ce gène dans un compartiment cellulaire ou tissulaire différent du compartiment d'accumulation des lipides,

(1B) soit une cassette d'expression  
30 comprenant un promoteur constitutif et un gène de lipase muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides.

Dans le second cas (2), le promoteur  
35 utilisé dans la cassette d'expression est du type contrôlable de façon exogène par des signaux physiques, chimiques ou biochimiques, en particulier promoteur de stress commandant l'expression sur application d'un

traumatisme physique sur les graines ou fruits.

Par exemple pour produire des acides gras à partir de plantes oléoprotéagineuses, on peut utiliser le mode de mise en oeuvre 1A ci-dessus évoqué :

5                   - la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlant l'expression d'une protéine déterminée de la graine, et en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de  
10 la plante de façon à faire exprimer la lipase dans les compartiments de la graine où s'accumulent la protéine précitée,

                  - la mise en contact des lipides et de la lipase est effectuée par simple broyage.

15                   Pour le colza, le promoteur de la protéine utilisé est avantageusement le promoteur de la napine qui permet une accumulation massive de lipase dans les corps protéiques de la graine, séparés des globules lipidiques.

                  Le mode de mise en oeuvre 1B ci-dessus peut  
20 être utilisé quel que soit le type de plante oléagineuse, par exemple en choisissant le promoteur constitutif 35S du CaMV (Virus de la mosaïque du chou-fleur) et la séquence d'adressage PR-S du tabac afin de diriger l'excrétion des lipases produites vers les compartiments extracellulaires.  
25 La mise en contact des lipides et des lipases est également effectuée dans ce cas par simple broyage.

                  Le mode de mise en oeuvre (2) ci-dessus peut être utilisé quel que soit le type de plante oléagineuse, par exemple en choisissant le promoteur  
30 inhibiteur de protéase isolé de la pomme de terre, qui commande l'expression des gènes en cas de blessures. Le traitement inducteur qui provoque la synthèse des lipases peut être dans ce cas une action de décorticage des graines, réalisée avant le broyage.

35                   De préférence, quel que soit le mode de mise en oeuvre choisi, on utilise un gène codant pour une lipase non spécifique, c'est-à-dire caractérisée par une activité hydrolytique non spécifique, afin d'obtenir une

- hydrolyse totale des lipides accumulés par la plante et d'éviter les réactions parasites de saponification. Il est toutefois possible, pour certaines utilisations des acides gras, de faire produire à la plante des lipases à activité
- 5 hydrolytique spécifique afin de favoriser un type donné d'hydrolyse (par exemple : monoacylglycérol lipase du *Penicillium camembertii* réalisant uniquement l'hydrolyse d'une des trois liaisons du glycérol avec les acides gras, en vue de la fabrication de diacylglycérols).
- 10 On peut en particulier utiliser des gènes de lipase non spécifique, caractérisé par les séquences suivantes ou par des séquences analogues aux séquences suivantes (les flèches délimitent la partie codante) :

## SEQUENCE I

1 GATGACAACT TGGTTGGTGG CATGACTTTG GACTTACCCA GCGATGCTCC  
 51 TCCTATCAGC CTCTCTAGCT CTACCAACAG CGCCTCTGAT GGTGGTAAGG  
 101 TTGTTGCTGC TACTACTGCT CAGATCCAAG AGTTCACCAA GTATGCTGGT  
 151 ATCGCTGCCA CTGCCTACTG TCGTTCTGTT GTCCCTGGTA ACAAGTGGGA  
 201 TTGTGTCCAA TGTCAAAAGT GGGTTCCTGA TGGCAAGATC ATCACTACCT  
 251 TTACCTCCTT GCTTTCCGAT ACAAATGGTT ACGTCTTGAG AAGTGATAAA  
 301 CAAAAGACCA TTTATCTTGT TTTCCGTGGT ACCAACTCCT TCAGAAGTGC  
 351 CATCACTGAT ATCGTCTTCA ACTTTTCTGA CTACAAGCCT GTCAAGGGCG  
 401 CCAAAGTTCA TGCTGGTTTC CTTTCCTCTT ATGAGCAAGT TGTCAATGAC  
 451 TATTTCCCTG TCGTCCAAGA ACAATTGACC GCCCACCCTA CTTATAAGGT  
 501 CATCGTTACC GGTCACCTCAC TCGGTGGTGC ACAAGCTTTG CTTGCCGGTA  
 551 TGGATCTCTA CCAACGTGAA CCAAGATTGT CTCCCAAGAA TTTGAGCATC  
 601 TTCCTGTCG GTGGTCCTCG TGTTGGTAAC CCCACCTTTG CTTACTATGT  
 651 TGAATCCACC GGTATCCCTT TCCAACGTAC CGTTCACAAG AGAGATATCG  
 701 TTCCTCACGT TCCTCCTCAA TCCTTCGGAT TCCTTCATCC CGGTGTTGAA  
 751 TCTTGGATGA AGTCTGGTAC TTCCAACGTT CAAATCTGTA CTTCTGAAAT  
 801 TGAAACCAAG GATTGCAGTA ACTCTATCGT TCCTTTCACC TCTATCCTTG  
 851 ACCACTTGAG TTACTTTGAT ATCAACGAAG GAAGCTGTTT GTAAAACACT  
 901 TGACGTGTTA CTCTAATTTT ATAATAAAAT TAAGTTTTTA TACAAT



## SEQUENCE II

1 GTCGACCAT T CAGCCTGTT TTGCTCGCAA AACGACGCCG CGGGCGTGCG  
5 51 CTACCGCACA CTCCGTCGCT GGGCGTTGTG CGGGGAAGAT TCAAACGAGC  
101 GTTTCGCGCC GTAACAACCC GCTCTCTTCC GCTCTGCCAC GCAGGTTATG  
151 ACCGGCCGCC AGGAAGCCGC GGATTTCCTG GCCTGGAGGA AAAAAGCCGA  
201 AGCTGGCACG GTTCCTGGCG CAAGGGACAG CGAAGCGGTT CTCCCGGAAG  
10 251 GATTCGGGCG ATGGCTGGCA GGACGCGCCC CTCGGCCCCA TCAACCTGAG  
301 ATGAGAACAA CATGAAGAAG AAGTCTCTGC TCCCCCTCGG CCTGGCCATC  
351 GGTCTCGCCT CTCTCGCTGC CAGCCCTCTG ATCCAGGCCA GCACCTACAC  
401 CCAGACCAAA TACCCCATCG TGCTGGCCCA CGGCATGCTC GGCTTCGACA  
15 451 ACATCCTCGG GGTCGACTAC TGGTTCGGCA TTCCCAGCGC CTTGCGCCGT  
501 GACGGTGCCC AGGTCTACGT CACCGAAGTC AGCCAGTTGG ACACCTCGGA  
551 AGTCCGCGGC GAGCAGTTGC TGCAACAGGT GGAGGAAATC GTCGCCCTCA  
601 GCGGCCAGCC CAAGGTCAAC CTGATCGGCC ACAGCCACGG CGGGCCGACC  
20 651 ATCCGCTACG TCGCCGCCGT ACGTCCCGAC CTGATCGCTT CCGCCACCAG  
701 CGTCGGCGCC CCGCACAAGG GTTCGGACAC CGCCGACTTC CTGCGCCAGA  
751 TCCACCGGG TTCGGCCGGC GAGGCAGTCC TCTCCGGGCT GGTCAACAGC  
801 CTCGGCGCGC TGATCAGCTT CCTTTCCAGC GGCAGCACCG GTACGCAGAA  
25 851 TTCACTGGGC TCGCTGGAGT CGCTGAACAG CGAGGGTGCC GCGCGCTTCA  
901 ACGCCAAGTA CCCGCAGGGC ATCCCCACCT CGGCCTGCGG CGAAGGCGCC  
951 TACAAGGTCA ACGGCGTGAG CTATTACTCC TGGAGCGGTT CCTCGCCGCT  
1001 GACCAACTTC CTCGATCCGA GCGACGCCTT CCTCGGCGCC TCGTCGCTGA  
30 1051 CCTTCAAGAA CGGCACCGCC AACGACGGCC TGGTCGGCAC CTGCAGTTCG  
1101 CACCTGGGCA TGGTGATCCG CGACAACTAC CGGATGAACC ACCTGGACGA  
1151 GGTGAACCAG GTCTTCGGCC TCACCAGCCT GTTCGAGACC AGCCCGGTCA  
1201 GCGTCTACCG CCAGCACGCC AACCGCCTGA AGAACGCCAG CCTGTAG

## SEQUENCE III

1 GGGTGCATGC CAGCTCCAC CGGACACCTG GCCCGTCGCT GAAAC3TGTT  
 51 TTCGCTTTCT CTACAAATCC AACAAACAGAG AGGCACTACC ATGGGTATCT  
 5 101 TTGACTATAA AAACCTTGGC ACCGAGGGTT CCAAAACGTT GTTCGCCGAT  
 151 GCCATGGCGA TCACGTTGTA TTCCTATCAC AACCTGGATA ACGGCTTTGC  
 201 CGTGGGCTAC CAGCACAACG GGTTGGGCTT GGGGCTACCG GCCACGCTGG  
 251 TCGGTGCGCT GCTCGGCAGC ACGGATTCCC AGGGCGTGAT CCCTGGCATC  
 301 CCGTGGAACC CGGATTCAGA AAAAGCCGCC CTTGAGGCGG TGCAGAAAGC  
 10 351 CGGTTGGACA CCGATCAGCG CCAGTGCCCT GGGCTACGCC GGCAAGGTGG  
 401 ATGCACGTGG CACCTTCTTT GGGGAAAAAG CCGGCTACAC CACGGCCCAG  
 451 GTCGAGGTAC TCGGCAAATA CGATGACGCC GGCAAGCTGC TCGAAATCGG  
 501 CATCGGTTTT CGTGGCACTT CGGGGCCACG GGAAACCTTG ATCAGCGACT  
 551 CGATCGGCGA CTTGATCAGC GATCTGCTCG CGGCCCTGGG GCCCAAGGAT  
 15 601 TACGCGAAAA ACTACGCCGG CGAAGCCTTC GGCGGCTTGC TCAAGAATGT  
 651 TGCCGACTAC GCCGGTGCCC ATGGCCTGAC CGGCAAGGAC GTGGTGGTCA  
 701 GCGGCCACAG CCTGGGCGGG CTGGCGGTCA ACAGCATGGC GGACTTGAGC  
 751 AACTACAAAT GGGCGGGGTT CTACAAGGAC GCCAACTATG TTGCCTATGC  
 801 CTCGCCGACC CAGAGTGCCG GCGACAAGGT GCTCAATATC GGTTACGAAA  
 20 851 ACGACCCGGT GTTCCGCGCG CTGGACGGCT CGTCGTTTAA CCTGTCGTGG  
 901 CTGGGCGTGC ACGACAAACC CCACGAGTCC ACCACCGATA ACATCGTCAG  
 951 CTTCAACGAC CACTACGCCT CGACGCTGTG GAATGTGCTG CCGTTTTCCA  
 1001 TCGTCAACCT GCCCACCTGG GTCTCGCATT TGCCGACGGC GTACGGCGAT  
 1051 GGCATGACGC GCATCCTCGA GTCCGGCTTC TACGACCAGA TGACCCGTGA  
 25 1101 CTCCACGGTG ATTGTTGCCA ACCTGTCCGA TCCGGCGCGG GCCAACACCT  
 1151 GGGTGCAGGA CCTCAACCGC AATGCCGAGC CCCACAAGGG CAACACGTTC  
 1201 ATCATCGGCA GCGACGGCAA CGACCTGATC CAGGGCGGCA ACGGTGCGGA  
 1251 CTTTATCGAG GGTGGCAAAG GCAACGACAC GATCCGCGAC AACAGCGGGC  
 1301 ACAACACCTT TTTGTTGAGC GGCCACTTTG GCAATGATCG CGTGATTGGC

1351 TACCAGCCCA CCGACAAACT GGTGTTCAAG GACGTGCAAG GAAGCACCGA  
1401 CCTGCGTGAC CACGCGAAGG TGGTCGGCGC CGATACGGTG CTTACGTTTG  
1451 GGGCCGACTC GGTGACGCTG GTCGGCGTGG GGCATGGCGG GCTGTGGACG  
5 1501 GAGGGCGTGG TGATCGGCTG ATTACTCACG CAACCGATCA GTGCCAGTGC  
1551 TGCCCCCGCC AGCCACCGCC CCAATTGGGC CGGTGGGGGT AGCCATAGCC

## SEQUENCE IV

1 GGGCGATGGC TGGCAGGACG CGCCCCCTCGG CCCCATCAAC CTGAGATGAG  
51 AACAAATGA AGAAGAAGTC TCTGCTCCCC CTCGGCCTGG CCATCGGCCT  
10 101 CGCCTCTCTC GCTGCCAGCC CTCTGATCCA GGCCAGCACC TACACCCAGA  
151 CCAAATACCC CATCGTGCTG GCCCACGGCA TGCTCGGCTT CGACAATATC  
201 CTCGGGGTTCG ACTACTGGTT CGGCATTCCC AGCGCCTTGC GCCGTGACGG  
251 TGCCCAGGTC TACGTCACCG AAGTCAGCCA GTTGGACACC TCGGAAGTCC  
301 GCGGCGAGCA GTTGCTGCAA CAGGTGGAGG AAATCGTCGC CCTCAGCGGC  
15 351 CAGCCCAAGG TCAACCTGAT CGGCCACAGC CACGGCGGGC CGACCATCCG  
401 CTACGTCGCC GCCGTACGTC CCGACCTGAT GCCTTCCGCC ACCAGCGTCG  
451 GCGCCCCGCA CAAGGGTTTCG GACACCGCCG ACTTCCTGCG CCAGATCCCA  
501 CCGGGTTTCGG CCGGCGAGGC AGTCCTCTCC GGGCTGGTCA ACAGCCTCGG  
551 CGCGCTGATC AGCTTCCTTT CCAGCGGCAG CGCCGGTACG CAGAATTCAC  
20 601 TGGGCTCGCT GGAGTCGCTG AACAGCGAGG GGGCCGCGCG CTTCAACGCC  
651 AAGTACCCGC AGGGCATCCC CACCTCGGCC TGCGGCGAAG GCGCCTACAA  
701 GGTCAACGGC GTGAGCTATT ACTCCTGGAG CGGTTCTCTG CCGCTGACCA  
751 ACTTCCTCGA TCCGAGCGAC GCCTTCCTCG GCGCCTCGTC GCTGACCTTC  
801 AAGAACGGCA CCGCTAACGA CGGCCTGGTC GGACCTGCA GTTCGTCCT  
25 851 GGGCATGGTG ATCCGCGACA ACTACCGGAT GAACCACCTG GACGAGGTGA  
901 ACCAGGTCTT CGGCCTCACC AGCCTGTTCG AGACCAGCCC GGTCAGCGTC  
951 TACCGCCAGC ACGCCAACCG CCTGAAGAAC GCCAGCCTGT AGGACCCCGG  
1001 CCGGGGCCTC GGCCCCGGCC CTTTCCCGGA AGCCCCCTCG CGTGAAGAAA  
1051 ATCCTCCTGC TGATTCCACT GCGTTCGCC GCCAGCCTGG CCTGGTTCGT

10

## SEQUENCE V

1: V CAGGCCCCCA CGGCCGTTCT TAATGGCAAC GAGGTCATCT CTGGTGTCTT  
51 TGGGGGCAAG GTTGATACCT TTAAGGGAAT TCCATTTGCT GACCCTCCTG  
5 101 TTGGTGACTT GCGGTTCAAG CACCCCCAGC CTTTCACTGG ATCCTACCAG  
151 GGTCTTAAGG CCAACGACTT CAGCTCTGCT TGTATGCAGC TTGATCCTGG  
201 CAATGCCATT TCTTGGCTTG ACAAAGTCGT GGGCTTGGGA AAGATTCTTC  
251 CTGATAACCT TAGAGGCCCT CTTTATGACA TGGCCCAGGG TAGTGTCTCC  
301 ATGAATGAGG ACTGTCTCTA CCTTAACGTT TTCCGCCCTG CTGGCACCAA  
10 351 GCCTGATGCT AAGCTCCCCG TCATGGTTTG GATTACGGT GGTGCCTTTG  
401 TGTTTGGTTC TTCTGCTTCT TACCCTGGTA ACGGCTACGT CAAGGAGAGT  
451 GTGGAAATGG GCCAGCCTGT TGTGTTTGTT TCCATCAACT ACCGTACCGG  
501 CCCCTATGGA TTCCTGGGTG GTGATGCCAT CACCGCTGAG GGTAACACCA  
551 ACGCTGGTCT GCACGACCAG CGCAAGGGTC TCGAGTGGGT TAGCGACAAC  
15 601 ATTGCCAACT TTGGTGGTGA TCCCGACAAG GTCATGATTT TCGGTGAGTC  
651 CGCTGGTGCC ATGAGTGTTG CTCACCAGCT TGTTGCCTAC GGTGGTGACA  
701 ACACCTACAA CGGAAAGAAG CTTTTCCACT CTGCCATTCT TCAGTCTGGC  
751 GGTCTCTTTC CTTACTTTGA CTCTACTTCT GTTGGTCCCG AGAGTGCCTA  
801 CAGCAGATTT GCTCAGTATG CCGGATGTGA TGCCAGCGCC AGTGACAAT  
20 851 AAACCTCTGGC TTGTCTCCGC AGCAAGTCCA GCGATGTCTT GCACAGTGCC  
901 CAGAACTCGT ACGATCTCAA GGACCTGTTT GGCCTGCTCC CTCAATTCCT  
951 TGGATTTGGT CCCAGACCCG ACGGCAACAT TATTCCCGAT GCCGCTTATG  
1001 AGCTCTACCG CAGCGGTAGA TACGCCAAGG TTCCCTACAT TACTGGTAAC  
1051 CAGGAGGATG AGGGTACTAT TCTTGCCCCC GTTGCTATTA ATGCTACCAC  
25 1101 GACTCCCCAT GTTAAGAAGT GGTTGAAGTA CATTTGTAGC GAGGCTTCTG  
1151 ACGCTTCGCT TGATCGTGTT TTGTCGCTCT ACCCCGGCTC TTGGTCGGAG  
1201 GGTGCGCCAT TCCGCACTGG TATTCTTAAT GCTCTGACCC CTCAGTTCAA  
1251 GCGCATTGCT GCCATTTTCA CTGATTTGCT GTTCCAGTCT CCTCGTCGTG  
1301 TTATGCTTAA CGCTACCAAG GACGTCAACC GCTGGACTTA CCTTGCCACC

1351 CAGCTCCATA ACCTCGTTCC ATTTTGGGT ACTTTCCATG GTAGTGATCT  
 1401 TCTTTTCCAA TACTACGTGG ACCTTGGCCC ATCTTCTGCT TACCGCCGCT  
 1451 ACTTTATCTC GTTTGCCAAC CACCACGACC CCAACGTTGG CACCAACCTG  
 5 1501 AAACAGTGGG ATATGTACAC TGATGCAGGC AAGGAGATGC TTCAGATTCA  
 1551 TATGGTTGGT AACTCTATGA GAACTGACGA CTTTAGAATC GAGGGAATCT  
 1601 CGAACTTTGA GTCTGACGTT ACTCTCTTCG GTTAA<sup>▼</sup>

## SEQUENCE VI

1 ATGGAGCTCG CTCTTGCGCT CCTGCTCATT GCCTCGGTGG CTGCT<sup>▼</sup>GCCCC  
 10 51 CACCGCCACG CTCGCCAACG GCGACACCAT CACCGGTCTC AACGCCATCA  
 101 TCAACGAGGC GTTCCTCGGC ATTCCCTTTG CCGAGCCGCC GGTGGGCAAC  
 151 CTCCGCTTCA AGGACCCCGT GCCGTACTCC GGCTCGCTCG ATGGCCAGAA  
 201 GTTCACGCTG TACGGCCCGC TGTGCATGCA GCAGAACCCC GAGGGCACCT  
 251 ACGAGGAGAA CCTCCCCAAG GCAGCGCTCG ACTTGGTGAT GCAGTCCAAG  
 15 301 GTGTTTGAGG CGGTGCTGCC GCTGAGCGAG GACTGTCTCA CCATCAACGT  
 351 GGTGCGGCCG CCGGGCACCA AGGCGGGTGC CAACCTCCCG GTGATGCTCT  
 401 GGATCTTTGG CGGCGGGTTT GAGGTGGGTG GCACCAGCAC CTTCCCTCCC  
 451 GCCCAGATGA TCACCAAGAG CATTGCCATG GGCAAGCCCA TCATCCACGT  
 501 GAGCGTCAAC TACCGCGTGT CGTCGTGGGG GTTCTTGGCT GGCGACGAGA  
 20 551 TCAAGGCCGA GGGCAGTGCC AACGCCGGTT TGAAGGACCA GCGCTTGGGC  
 601 ATGCAGTGGG TGGCGGACAA CATTGCGGCG TTTGGG<sup>▼</sup>GGCG ACCCGACCAA  
 651 GGTGACCATC TTTGGCGAGC TGGCGGGCAG CATGTCGGTC ATGTGCCACA  
 701 TTCTCTGGAA CGACGGCGAC AACACGTACA AGGGCAAGCC GCTCTTCCGC  
 751 GCGGGCATCA TGCAGCTGGG GGCCATGGTG CCGCTGGACG CCGTGGACGG  
 25 801 CATCTACGGC AACGAGATCT TTGACCTCTT GGCCTCGAAC GCGGGCTGCG  
 851 GCAGCGCCAG CGACAAGCTT GCGTGCTTGC GCGGTGTGCT GAGCGACACG  
 901 TTGGAGGACG CCACCAACAA CACCCCTGGG TTCTTGGCGT ACTCCTCGTT

951 GCGGTTGCTG TACCTCCCCC GGCCCGACGG CGTGAACATC ACCGACGACA  
1001 TGTACGCCTT GGTGCGCGAG GGCAAGTATG CCAACATCCC TGTGATCATC  
1051 GGCGACCAGA ACGACGAGGG CACCTTCTTT GGCACCCTGC TGTTGAACGT  
5 1101 GACCACGGAT GCCCAGGCCC GCGAGTACTT CAAGCAGCTG TTTGTCCACG  
1151 CCAGCGACGC GGAGATCGAC ACGTTGATGA CGGCGTACCC CGGCGACATC  
1201 ACCCAGGGCC TGCCGTTCTGA CACGGGTATT CTCAACGCCC TCACCCCGCA  
1251 GTTCAAGAGA ATCCTGGCGG TGCTCGGCGA CCTTGGCTTT ACGCTTGCTC  
1301 GTCGCTACTT CCTCAACCAC TACACCGGCG GCACCAAGTA CTCATTCTC  
10 1351 CTGAAGCAGC TCCTGGGCTT GCCGGTGCTC GGAACGTTCC ACTCCAACGA  
1401 CATTGTCTTC CAGGACTACT TGTTGGGCAG CGGCTCGCTC ATCTACAACA  
1451 ACGCGTTCAT TCGGTTTGCC ACGGACTTGG ACCCCAACAC CGCGGGGTTG  
1501 TTGGTGAAGT GGCCCGAGTA CACCAGCAGC CTGCAGCTGG GCAACAACCT  
1551 GATGATGATC AACGCCTTGG GCTTGTACAC CGGCAAGGAC AACTTCCGCA  
15 1601 CCGCCGGCTA CGACGCGTTG TTCTCCAACC CGCCGCTGTT CTTTGTGTAA

La séquence I correspond à un cDNA de *Rhizopus niveus*, la séquence II peut être isolée à partir du génome de *Pseudomonas aeruginosa*, la séquence III à partir de *Pseudomonas fluorescens*, la séquence IV à partir de *Pseudomonas sp.*, la séquence V à partir de *Geotrichum candidum*, la séquence VI à partir de *Candida cylindracea*.

Par ailleurs, l'introduction de la cassette d'expression : gène de lipase/promoteur d'expression de ce gène, dans le génome de la plante oléagineuse peut être réalisée par tout protocole connu.

Par exemple, selon le protocole le plus courant actuellement, cette cassette d'expression peut être introduite dans le génome de cellules somatiques de la plante par un transfert à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Cette introduction dans lesdites cellules somatiques de la plante peut également être réalisée par une autre technique connue, notamment par électroporation, par biolistique ou par microinjection.

Il est également possible d'introduire la cassette d'expression dans le génome de microspores de la plante par électroporation ou biolistique.

Dans le protocole fourni plus loin à titre d'exemple, on a décrit la technique d'électroporation pour l'introduction de la cassette dans les microspores du colza.

On pourra se reporter au document suivant "P.J.J. Hooykaas et R.A. Schilperoort, TIBS août 1985, p. 305-309" pour plus de détail sur la technique de transfert à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. On rappelle que cette technique consiste à introduire la cassette d'expression concernée dans le plasmide Ti de la bactérie notamment par choc thermique, puis à mettre en contact la bactérie avec des disques de feuilles de la plante, à laisser incuber l'ensemble jusqu'à obtenir le transfert de la cassette d'expression dans le génome des cellules des disques foliaires, et à cultiver ces disques foliaires sur une succession de milieux jusqu'à régénération des plantes transgéniques.

On pourra se reporter au document suivant "J.A. Russell et al., In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28P, p. 97-105" pour plus de détail sur la technique de biolistique. On rappelle que cette technique consiste à  
5 fixer le plasmide contenant la cassette d'expression sur des microbilles d'or ou de tungstène, à projeter ces microbilles à l'aide d'un canon à particules sur les cellules de la plante à transformer, et à cultiver ces cellules jusqu'à régénération des plantes transgéniques.

10 On pourra se reporter au document suivant "Crossway A et Al, 1986, Mol. Gen. Genet 202, 179-185" pour plus de détail sur la technique de micro-injection. On rappelle que cette technique consiste à injecter dans des protoplastes ou de très jeunes embryons le plasmide  
15 contenant la cassette d'expression à l'aide de micro-seringues, et à cultiver les protoplastes jusqu'à régénération des plantes transgéniques.

Après mise au contact par broyage de la lipase et des lipides, on laisse incuber l'ensemble pour  
20 réaliser l'hydrolyse enzymatique. Cette incubation est réalisée dans des conditions classiques, en particulier entre 20° C et 60° C, pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une hydrolyse totale ou quasi-totale.

L'extraction des acides gras issus de  
25 l'hydrolyse est ensuite opérée par tout procédé connu, en particulier par une extraction liquide/liquide utilisant un solvant apolaire tel que le chloroforme ou l'hexane.

Selon un autre mode de mise en oeuvre, il est possible de réaliser in situ une transformation des  
30 acides gras pour obtenir des dérivés d'acides gras qui sont ensuite extraits. Par exemple, les acides gras issus de l'hydrolyse peuvent être méthylés in situ par mise en contact avec du méthanol en catalyse acide sous ultrasons en vue de les transformer en esters méthyliques, ces  
35 derniers étant extraits par une extraction liquide/liquide utilisant un solvant apolaire.

La présente demande vise, en tant que produit nouveau, toute plante oléagineuse ou semence de



plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, qui comprend dans son génome une cassette d'expression possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène dans des compartiments cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents des compartiments lipidiques de la plante ou de la semence.

Le promoteur associé au gène de lipase peut être un promoteur à expression cellulaire ou tissulaire spécifique. Ce promoteur peut également être un promoteur constitutif, auquel cas le gène de lipase est muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents des compartiments d'accumulation des lipides.

La présente demande vise également toute plante oléagineuse ou semence de plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, qui comprend dans son génome une cassette d'expression possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène sur induction exogène, en particulier par un stress.

La description qui suit en référence au dessin fournit à titre d'exemple un protocole de mise en oeuvre du procédé de l'invention ; la figure 1 du dessin schématise la préparation du matériel génétique à transférer.

#### 1/ PROTOCOLE D'OBTENTION DE PLANTES TRANSGENIQUES DE COLZA EXPRIMANT UN GENE DE LIPASE

##### a) Matériel végétal

On utilise des graines de colza (*Brassica napus*, Var Tapidor) qui sont obtenues dans le commerce.

Les graines sont semées en serre et cultivées dans des conditions standard. L'état sanitaire des plantes est rigoureusement surveillé.

Les jeunes bourgeons (taille inférieure à 3,5 mm) sont prélevés, stérilisés dans l'hypochlorite de

sodium pendant 30 minutes et les microspores sont extraites des anthères par broyage au Waring Blendor dans le milieu de Huang et al (Huang et al. 1990, Plant. Cell. Rep. 8, 594-597). Après filtration sur un tamis métallique de 50 µm  
5 de vide de maille, les microspores sont récupérées par centrifugation 5 minutes à 100xg (Protocole décrit dans : Jardinaud et al., 1993, Plant. Sci. 93, 177-184).

#### b) Construction génétique

La construction génétique retenue met en  
10 oeuvre le promoteur de la napine, le cDNA de la lipase de *Rhizopus niveus* et le terminateur NOS. Le promoteur de la napine dirige l'expression de cette protéine dans un compartiment protéique de la graine différent de celui où s'accumulent les lipides. L'ensemble est introduit dans le  
15 plasmide pRT1 contenant le gène de sélection *pat* utilisé pour cribler les transformants en vue de former la construction pRT1L.

Le détail de la construction est donné à la figure 1 du dessin.

20 Le promoteur napine désigné "Prom. Nap" a été isolé par l'équipe du Professeur Rask (Stalberg K. et al, 1993, Plant Molecular Biology, 23 : 671-683). Le cDNA de la lipase de *Rhizopus niveus*, désigné "Lip", a été isolé par le Central Research Institute (Kugimiya et al., 1992,  
25 Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719). Un codon d'initiation, désigné "start codon", compatible avec l'extrémité 5' du cDNA (disponible sur le marché) est greffé sur cette extrémité. Sur l'extrémité 3' de l'ensemble obtenu, désigné "lip", on greffe un terminateur  
30 désigné NOS extrait du plasmide pRT1 ci-après évoqué et, sur l'extrémité 5', le promoteur Nap.

La cassette d'expression ainsi obtenue est introduite dans un plasmide désigné "Blue-Script" (nom commercial) en vue d'en réaliser l'amplification.

35 La cassette d'expression amplifiée est ensuite extraite de "Blue-Script" et introduite dans un plasmide désigné pRT1 qui a été préparé en greffant le promoteur désigné CaMV35S sur l'extrémité 5' du gène "pat"

codant pour la phosphinothricine acétyl transférase (gène de sélection) et le terminateur NOS sur l'extrémité 3'.

On obtient un plasmide désigné pRT1L contenant la cassette d'expression visée.

5           c) Transfert de gène et production des plantes transgéniques

Les microspores isolées en a) ( $10^6$  microspores  $\text{ml}^{-1}$ ) sont mises en suspension dans le milieu de Brewbaker et Kwack (J.L. Brewbaker et B.H. Kwack, 10 1963, Am. J. Bot. 50, p. 859-865) contenant 13 % de saccharose et ajusté à pH 5,9. 50 $\mu\text{g}$  par ml du plasmide pRT1L sont ajoutés au milieu et des impulsions électriques de 400 V/cm pendant 10 ms sont appliquées à la suspension à l'aide d'un électroporateur "Jouan" (marque 15 déposée) (TRX, GHT) délivrant des impulsions en vague carrée. Après 20 minutes de repos, le milieu de culture (Huang et al.) contenant 100 mg/l de phosphinothricine est ajouté aux microspores. Les microspores sont cultivées à l'obscurité 24 h à 35° C puis à 25° C. Après 2 semaines de 20 culture un volume égal de milieu neuf est ajouté et les microspores placées à la lumière sous photopériode 16 h jour / 8 h obscurité.

Après environ 1 mois les embryons sont transférés en milieu B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1979, Exp. Cell. 25 Res. 50, 151-158) contenant G3A<sub>3</sub> 1 ml/g, 20g/l saccharose et solidifié par 8/l de gélifiant "Bacto Agar" (marque déposée).

Les plantes régénérées résistantes à la phosphinothricine sont analysées en "southern" de façon à 30 vérifier la présence dans leur génome de la séquence codant pour la lipase. Le stock chromosomique des plantes retenues est doublé par la colchicine (0,1 g/l plus quelques gouttes de teepol) et les plantes diploïdes fertiles produites sont autofécondées.

35           Sur un nombre restreint de graines, on recherche l'activité de la lipase. Les plantes présentant des graines dont l'activité lipase est la plus élevée sont retenues et les graines utilisées pour la multiplication

des plantes jusqu'à obtention d'un stock de graines suffisant pour réaliser les expériences d'hydrolyse des lipides de la graine par les lipases endogènes.

5 2/ HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES LIPIDES DES GRAINES DE COLZA  
OBTENUES

Les graines sont broyées, le broyat placé dans un incubateur maintenu à la température constante de 40°. Le broyat est soumis à une agitation permanente de  
10 façon à augmenter le contact entre les lipides et la lipase.

Après 48 h d'hydrolyse, les acides gras sont extraits par le chloroforme. Le chloroforme est évaporé et les acides gras récupérés.

## REVENDEICATIONS

1/ - Procédé de production d'acides gras ou de dérivés d'acides gras à partir de plantes oléagineuses, caractérisé en ce que :

5                   - on produit des plantes oléagineuses transgéniques possédant, d'une part, au moins un gène codant pour une enzyme lipase, dit gène de lipase, d'autre part, associé à ce gène de lipase, un promoteur permettant une expression dudit gène soit dans des compartiments  
10 cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides de la plante, soit sur induction exogène,

                  - on recueille les graines ou fruits contenant les lipides desdites plantes,

15                   - on broie ledites graines ou fruits, le cas échéant après traitement inducteur, de façon à mettre en contact les lipides et la lipase contenue dans lesdites graines ou fruits,

                  - on laisse incuber l'ensemble pour engendrer une hydrolyse enzymatique des lipides du broyat  
20 sous l'action catalytique de la lipase contenue dans ledit broyat,

                  - on extrait les acides gras issus de l'hydrolyse ou on les transforme pour obtenir les dérivés  
25 d'acides gras recherchés.

2/ - Procédé selon la revendication 1, dans lequel on produit les plantes transgéniques en effectuant une transformation génétique d'une plante oléagineuse naturelle, en amenant la plante génétiquement transformée à  
30 se multiplier par la voie sexuée pour la production de semences transgéniques et en utilisant lesdites semences pour l'obtention de plantes transgéniques descendantes.

3/ - Procédé selon la revendication 2 pour la production d'acides gras à partir de plantes  
35 oléoprotéagineuses, caractérisé en ce que :

                  - la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlant

l'expression d'une protéine déterminée de la graine, et en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de la plante de façon à faire exprimer la lipase dans les compartiments de la graine où s'accumulent la protéine  
5 précitée,

- la mise en contact des lipides et de la lipase est effectuée par simple broyage.

4/ - Procédé selon la revendication 3 pour la production d'acides gras à partir de colza, caractérisé  
10 en ce que la transformation génétique est effectuée à partir d'une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et le promoteur de la napine.

5/ - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que :

15 . la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlable de façon exogène, et en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de la plante,

20 . un traitement inducteur est appliqué aux graines et fruits avant broyage de façon à provoquer la synthèse de la lipase.

6/ - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que :

25 . la transformation génétique est effectuée à partir d'une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur de stress,

30 . le traitement inducteur est constitué par un traumatisme physique appliqué sur les graines ou fruits avant le broyage.

7/ - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que :

35 . la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un promoteur constitutif et un gène de lipase muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides,

. la mise en contact des lipides et de la lipase est effectuée par simple broyage.

8/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on produit des plantes transgéniques possédant un gène de lipase caractérisée par une activité hydrolytique non spécifique.

9/ - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on produit des plantes transgéniques possédant un gène de lipase caractérisé par une séquence identique ou analogue à l'une des séquences suivantes (les flèches délimitent la partie codante) :

# SEQUENCE I

```

1  GATGACAACT TGGTTGGTGG CATGACTTTG GACTTACCCA GCGATGCTCC
51 TCCTATCAGC CTCTCTAGCT CTACCAACAG CGCCTCTGAT GGTGGTAAGG
101 TTGTTGCTGC TACTACTGCT CAGATCCAAG AGTTCACCAA GTATGCTGGT
151 ATCGCTGCCA CTGCCTACTG TCGTTCTGTT GTCCCTGGTA ACAAGTGGGA
201 TTGTGTCCAA TGTCAAAAGT GGGTTCCTGA TGGCAAGATC ATCACTACCT
251 TTACCTCCTT GCTTTCCGAT ACAAATGGTT ACGTCTTGAG AAGTGATAAA
301 CAAAAGACCA TTTATCTTGT TTTCCGTGGT ACCAACTCCT TCAGAAGTGC
351 CATCACTGAT ATCGTCTTCA ACTTTTCTGA CTACAAGCCT GTCAAGGGCG
401 CCAAAGTTCA TGCTGGTTTC CTTTCCTCTT ATGAGCAAGT TGTCATGAC
451 TATTTCCCTG TCGTCCAAGA ACAATTGACC GCCCACCCTA CTTATAAGGT
501 CATCGTTACC GGTCCTCAC TCGGTGGTGC ACAAGCTTTG CTTGCCGGTA
551 TGGATCTCTA CCAACGTGAA CCAAGATTGT CTCCAAGAA TTTGAGCATC
601 TTCCTGTCG GTGGTCCTCG TGTTGGTAAC CCCACCTTTG CTTACTATGT
651 TGAATCCACC GGTATCCCTT TCCAACGTAC CGTTCACAAG AGAGATATCG
701 TTCCTCACGT TCCTCCTCAA TCCTTCGGAT TCCTTCATCC CGGTGTTGAA
751 TCTTGATGA AGTCTGGTAC TTCCAACGTT CAAATCTGTA CTTCTGAAAT
801 TGAAACCAAG GATTGCAGTA ACTCTATCGT TCCTTTCACC TCTATCCTTG
851 ACCACTTGAG TTACTTTGAT ATCAACGAAG GAAGCTGTTT GTAAAACACT
901 TGACGTGTTA CTCTAATTTT ATAATAAAAT TAAGTTTTTA TACAAAT

```

## SEQUENCE II

1 GTCGACCATT TCAGCCTGTT TTGCTCGCAA AACGACGCCG CGGGCGTGCG  
51 CTACCGCACA CTCGTCGCT GGGCGTTGTG CGGGGAAGAT TCAAACGAGC  
5 101 GTTTCGCGCC GTAACAACCC GCTCTCTTCC GCTCTGCCAC GCAGGTTATG  
151 ACCGGCCGCC AGGAAGCCGC GGATTTCTTG GCCTGGAGGA AAAAAGCCGA  
201 AGCTGGCACG GTTCCTGGCG CAAGGGACAG CGAAGCGGTT CTCCCGGAAG  
251 GATTCGGGCG ATGGCTGGCA GGACGCGCCC CTCGGCCCCA TCAACCTGAG  
301 ATGAGAACAA CATGAAGAAG AAGTCTCTGC TCCCCCTCGG CCTGGCCATC  
10 351 GGTCTCGCCT CTCTCGCTGC CAGCCCTCTG ATCCAGGCCA GCACCTACAC  
401 CCAGACCAAA TACCCCATCG TGCTGGCCCA CGGCATGCTC GGCTTCGACA  
451 ACATCCTCGG GGTCGACTAC TGGTTCGGCA TTCCACAGCGC CTTGCGCCGT  
501 GACGGTGCCC AGGTCTACGT CACCGAAGTC AGCCAGTTGG ACACCTCGGA  
551 AGTCCGCGGC GAGCAGTTGC TGCAACAGGT GGAGGAAATC GTCGCCCTCA  
15 601 GCGGCCAGCC CAAGGTCAAC CTGATCGGCC ACAGCCACGG CGGGCCGACC  
651 ATCCGCTACG TCGCCGCGT ACGTCCCGAC CTGATCGCTT CCGCCACCAG  
701 CGTCGGCGCC CCGCACAAGG GTTCGGACAC CGCCGACTTC CTGCGCCAGA  
751 TCCCACCGGG TTCGGCCGGC GAGGCAGTCC TCTCCGGGCT GGTCAACAGC  
801 CTCGGCGCGC TGATCAGCTT CCTTTCCAGC GGCAGCACCG GTACGCAGA  
20 851 TTCACTGGGC TCGCTGGAGT CGCTGAACAG CGAGGGTGCC GCGCGCTTCA  
901 ACGCCAAGTA CCCGCAGGGC ATCCCCACCT CGGCCTGCGG CGAAGGCGCC  
951 TACAAGGTCA ACGGCGTGAG CTATTACTCC TGGAGCGGTT CCTCGCCGCT  
1001 GACCAACTTC CTCGATCCGA GCGACGCCTT CCTCGGCGCC TCGTCGCTGA  
1051 CCTTCAAGAA CGGCACCGCC AACGACGGCC TGGTCGGCAC CTGCAGTTCC  
25 1101 CACCTGGGCA TGGTGATCCG CGACAACTAC CGGATGAACC ACCTGGACGA  
1151 GGTGAACCAG GTCTTCGGCC TCACCAGCCT GTTCGAGACC AGCCCGGTCA  
1201 GCGTCTACCG CCAGCACGCC AACCGCCTGA AGAACGCCAG CCTGTAG



## SEQUENCE III

1 GGGTGCATGC CAGCTCCAC CGGACACCTG GCCCGTCGCT GAAACGTGT  
51 TTCGCTTTCT CTACAAATCC AACAAACAGAG AGGCACTACC **V**ATGGGTATCT  
5 101 TTGACTATAA AAACCTTGGC ACCGAGGGTT CCAAACGTT GTTCGCCGAT  
151 GCCATGGCGA TCACGTTGTA TTCCTATCAC AACCTGGATA ACGGCTTTGC  
201 CGTGGGCTAC CAGCACAACG GGTGTTGGCTT GGGGCTACCG GCCACGCTGG  
251 TCGGTGCGCT GCTCGGCAGC ACGGATTCCC AGGGCGTGAT CCCTGGCATC  
301 CCGTGGAACC CGGATTCAGA AAAAGCCGCC CTTGAGGCGG TGCAGAAAGC  
10 351 CGGTTGGACA CCGATCAGCG CCAGTGCCCT GGGCTACGCC GGCAAGGTCC  
401 ATGCACGTGG CACCTTCTTT GGGGAAAAG CCGGCTACAC CACGGCCCAG  
451 GTCGAGGTAC TCGGCAAATA CGATGACGCC GGCAAGCTGC TCGAAATCGG  
501 CATCGGTTTT CGTGGCACTT CGGGGCCACG GGAAACCTTG ATCAGCGACT  
551 CGATCGGCGA CTTGATCAGC GATCTGCTCG CGGCCCTGGG GCCCAAGGAT  
15 601 TACGCGAAAA ACTACGCCGG CGAAGCCTTC GGCGGCTTGC TCAAGAATGT  
651 TGCCGACTAC GCCGGTGCCC ATGGCCTGAC CGGCAAGGAC GTGGTGGTCA  
701 GCGGCCACAG CCTGGGCGGG CTGGCGGTCA ACAGCATGGC GGA CTTGAGC  
751 AACTACAAAT GGGCGGGGTT CTACAAGGAC GCCAACTATG TTGCCTATGC  
801 CTCGCCGACC CAGAGTGCCG GCGACAAGGT GCTCAATATC GGTTACGAAA  
20 851 ACGACCCGGT GTTCCGCGCG CTGGACGGCT CGTCGTTTAA CCTGTGCTCG  
901 CTGGGCGTGC ACGACAAACC CCACGAGTCC ACCACCGATA ACATCGTCAG  
951 CTTCAACGAC CACTACGCTT CGACGCTGTG GAATGTGCTG CCGTTTTCCA  
1001 TCGTCAACCT GCCCACCTGG GTCTCGCATT TGCCGACGGC GTACGGCGAT  
1051 GGCATGACGC GCATCCTCGA GTCCGGCTTC TACGACCAGA TGACCCGTGA  
25 1101 CTCCACGGTG ATTGTTGCCA ACCTGTCCGA TCCGGCGCGG GCCAACACCT  
1151 GGGTGCAGGA CCTCAACCGC AATGCCGAGC CCCACAAGGG CAACACGTTT  
1201 ATCATCGGCA GCGACGGCAA CGACCTGATC CAGGGCGGCA ACGGTGCGGA  
1251 CTTTATCGAG GGTGGCAAAG GCAACGACAC GATCCGCGAC AACAGCGGGC  
1301 ACAACACCTT TTTGTTGAGC GGCCACTTTG GCAATGATCG CGTGATTGGC

1351 TACCAGCCCA CCGACAACT GGTGTTCAAG GACGTGCAAG GAAGCACCGA  
 1401 CCTGCGTGAC CACGCGAAGG TGGTCGGCGC CGATACGGTG CTTACGTTTG  
 1451 GGGCCGACTC GGTGACGCTG GTCGGCGTGG GGCATGGCGG GCTGTGGACG  
 5 1501 GAGGGCGTGG TGATCGGCTG ATTACTCAG CAACCGATCA GTGCCAGTGC  
 1551 TGCCCCCGCC AGCCACCGCC CCAATTGGGC CGGTGGGGGT AGCCATAGCC

## SEQUENCE IV

1 GGGCGATGGC TGGCAGGACG CGCCCTCGG CCCCATCAAC CTGAGATGAG  
 51 AACAAATGA AGAAGAAGTC TCTGCTCCCC CTCGGCCTGG CCATCGGCCT  
 10 101 CGCCTCTCTC GGTGCCAGCC CTCTGATCCA GGCCAGCACC TACACCCAGH  
 151 CCAAATACCC CATCGTGCTG GCCCAGGCA TGCTCGGCTT CGACAATATC  
 201 CTCGGGGTCG ACTACTGGTT CGGCATTCCC AGCGCCTTGC GCCGTGACGG  
 251 TGCCCAGGTC TACGTCACCG AAGTCAGCCA GTTGGACACC TCGGAAGTCC  
 301 GCGGCGAGCA GTTGCTGCAA CAGGTGGAGG AAATCGTCGC CCTCAGCGGC  
 15 351 CAGCCCAAGG TCAACCTGAT CGGCCACAGC CACGGCGGGC CGACCATCCG  
 401 CTACGTCGCC GCCGTACGTC CCGACCTGAT GCCTTCCGCC ACCAGCGTCG  
 451 GCGCCCCGCA CAAGGGTTCTG GACACCGCCG ACTTCCTGCG CCAGATCCCA  
 501 CCGGGTTCTG CCGGCGAGGC AGTCCTCTCC GGGCTGGTCA ACAGCCTCGG  
 551 CGCGCTGATC AGCTTCCTTT CCAGCGGCAG CGCCGGTACG CAGAATTC  
 20 601 TGGGCTCGCT GGAGTCGCTG AACAGCGAGG GGGCCGCGCG CTTCAACGCC  
 651 AAGTACCCGC AGGGCATCCC CACCTCGGCC TGCGGCGAAG GCGCCTACAA  
 701 GGTCAACGGC GTGAGCTATT ACTCCTGGAG CGGTTCTCTG CCGCTGACCA  
 751 ACTTCCTCGA TCCGAGCGAC GCCTTCCTCG GCGCCTCGTC GCTGACCTTC  
 801 AAGAACGGCA CCGCTAACGA CGGCCTGGTC GGCACCTGCA GTTCGCACCT  
 25 851 GGGCATGGTG ATCCGCGACA ACTACCGGAT GAACCACCTG GACGAGGTGA  
 901 ACCAGGTCTT CGGCCTCACC AGCCTGTTCTG AGACCAGCCC GGTCAGCGTC  
 951 TACCGCCAGC ACGCCAACCG CCTGAAGAAC GCCAGCCTGT AGGACCCCGG  
 1001 CCGGGGCCTC GGCCCCGGCC CTTTCCCGGA AGCCCCCTCG CGTGAAGAAA  
 1051 ATCCTCCTGC TGATTCCAAT GGC GTTCGCC GCCAGCCTGG CCTGGTTCTG

## SEQUENCE V

1 CAGGCCCCCA CGGCCGTTCT TAATGGCAAC GAGGTCATCT CTGGTGTCTT  
51 TGGGGGCAAG GTTGATACCT TTAAGGGAAT TCCATTTGCT GACCCTCCTG  
5 101 TTGGTGACTT GCGGTTCAAG CACCCCCAGC CTTTCACTGG ATCCTACCAG  
151 GGTCTTAAGG CCAACGACTT CAGCTCTGCT TGTATGCAGC TTGATCCTGG  
201 CAATGCCATT TCTTGGCTTG ACAAAGTCGT GGGCTTGGA AAGATTCTTC  
251 CTGATAACCT TAGAGGCCCT CTTTATGACA TGGCCAGGG TAGTGTCTCC  
301 ATGAATGAGG ACTGTCTCTA CCTTAACGTT TTCCGCCCTG CTGGCACCAA  
10 351 GCCTGATGCT AAGCTCCCCG TCATGGTTTG GATTTACGGT GGTGCCTTTG  
401 TGTTTGGTTC TTCTGCTTCT TACCCTGGTA ACGGCTACGT CAAGGAGAGT  
451 GTGGAAATGG GCCAGCCTGT TGTGTTTGTT TCCATCAACT ACCGTACCGG  
501 CCCCTATGGA TTCCTGGGTG GTGATGCCAT CACCGCTGAG GGTAACACCA  
551 ACGCTGGTCT GCACGACCAG CGCAAGGGTC TCGAGTGGGT TAGCGACAAC  
15 601 ATTGCCAACT TTGGTGGTGA TCCCGACAAG GTCATGATTT TCGGTGAGTC  
651 CGCTGGTGCC ATGAGTGTTG CTCACCAGCT TGTTGCCTAC GGTGGTGACA  
701 ACACCTACAA CGGAAAGAAG CTTTTCCACT CTGCCATTCT TCAGTCTGGC  
751 GGTCCTCTTC CTTACTTTGA CTCTACTTCT GTTGGTCCCG AGAGTGCCTA  
801 CAGCAGATTT GCTCAGTATG CCGGATGTGA TGCCAGCGCC AGTGACAATG  
20 851 AAACCTCTGGC TTGTCTCCGC AGCAAGTCCA GCGATGTCTT GCACAGTGCC  
901 CAGAACTCGT ACGATCTCAA GGACCTGTTT GGCCTGCTCC CTCAATTCTT  
951 TGGATTTGGT CCCAGACCCG ACGGCAACAT TATCCCGAT GCCGCTTATG  
1001 AGCTCTACCG CAGCGGTAGA TACGCCAAGG TTCCCTACAT TACTGGTAAC  
1051 CAGGAGGATG AGGGTACTAT TCTTGCCCCC GTTGCTATTA ATGCTACCAC  
25 1101 GACTCCCCAT GTTAAGAAGT GGTGAAGTA CATTTGTAGC GAGGCTTCTG  
1151 ACGCTTCGCT TGATCGTGT TGTGCTCTT ACCCCGGCTC TTGGTCGGAG  
1201 GGTGCGCCAT TCCGCACTGG TATTCTTAAT GCTCTGACCC CTCAGTTCAA  
1251 GCGCATTGCT GCCATTTTCA CTGATTTGCT GTTCCAGTCT CCTCGTCGTG  
1301 TTATGCTTAA CGCTACCAAG GACGTCAACC GCTGGACTTA CCTTGCCACC

1351 CAGCTCCATA ACCTCGTTCC ATTTTGGGT ACTTTCCATG GTAGTGATCT  
 1401 TCTTTTCCAA TACTACGTGG ACCTTGGCCC ATCTTCTGCT TACCGCCGCT  
 1451 ACTTTATCTC GTTTGCCAAC CACCACGACC CCAACGTTGG CACCAACCTG  
 5 1501 AAACAGTGGG ATATGTACAC TGATGCAGGC AAGGAGATGC TTCAGATTCA  
 1551 TATGGTTGGT AACTCTATGA GAACTGACGA CTTTAGAATC GAGGGAATCT  
 1601 CGAACTTTGA GTCTGACGTT ACTCTCTTCG GTTAA<sup>!</sup>

## SEQUENCE VI

1 ATGGAGCTCG CTCTTGCGCT CCTGCTCATT GCCTCGGTGG CTGCT<sup>!</sup>GCCCC  
 10 51 CACCGCCACG CTCGCCAACG GCGACACCAT CACCGGTCTC AACGCCATCA  
 101 TCAACGAGGC GTTCCTCGGC ATTCCCTTTG CCGAGCCGCC GGTGGGCAAC  
 151 CTCCGCTTCA AGGACCCCGT GCGTACTCC GGCTCGCTCG ATGGCCAGAA  
 201 GTTCACGCTG TACGGCCCGC TGTGCATGCA GCAGAACCCC GAGGGCACCT  
 251 ACGAGGAGAA CCTCCCCAAG GCAGCGCTCG ACTTGGTGAT GCAGTCCAAG  
 15 301 GTGTTTGAGG CGGTGCTGCC GCTGAGCGAG GACTGTCTCA CCATCAACGT  
 351 GGTGCGGCCG CCGGGCACCA AGGCGGGTGC CAACCTCCCG GTGATGCTCT  
 401 GGATCTTTGG CGGCGGGTTT GAGGTGGGTG GCACCAGCAC CTTCCTC  
 451 GCCCAGATGA TCACCAAGAG CATTGCCATG GGCAAGCCCA TCATCCACGT  
 501 GAGCGTCAAC TACCGCGTGT CGTCGTGGGG GTTCTTGGCT GGCGACGAGA  
 20 551 TCAAGGCCGA GGGCAGTGCC AACGCCGGTT TGAAGGACCA GCGCTTGGGC  
 601 ATGCAGTGGG TGGCGGACAA CATTGCGGCG TTTGGCGGCG ACCCGACCAA  
 651 GGTGACCATC TTTGGCGAGC TGGCGGGCAG CATGTCGGTC ATGTGCCACA  
 701 TTCTCTGGAA CGACGGCGAC AACACGTACA AGGGCAAGCC GCTCTTCCGC  
 751 GCGGGCATCA TGCAGCTGGG GGCCATGGTG CCGCTGGACG CCGTGGACGG  
 25 801 CATCTACGGC AACGAGATCT TTGACCTCTT GGCGTCGAAC GCGGGCTGCG  
 851 GCAGCGCCAG CGACAAGCTT GCGTGCTTGC GCGGTGTGCT GAGCGACACG  
 901 TTGGAGGACG CCACCAACAA CACCCTGGG TTCTTGGCGT ACTCCTCGTT

951 GCGGTTGCTG TACCTCCCCC GGCCCGACGG CGTGAACATC ACCGACGACA  
1001 TGTACGCCTT GGTGCGCGAG GGCAAGTATG CCAACATCCC TGTGATCATC  
1051 GGCGACCAGA ACGACGAGGG CACCTTCTTT GGCACCCTGC TGTGAAACGT  
5 1101 GACCACGGAT GCCCAGGCCG GCGAGTACTT CAAGCAGCTG TTTGTCCACG  
1151 CCAGCGACGC GGAGATCGAC ACGTTGATGA CGGCGTACCC CGGCGACATC  
1201 ACCCAGGGCC TGCCGTTCTGA CACGGGTATT CTCAACGCCC TCACCCCGCA  
1251 GTTCAAGAGA ATCCTGGCGG TGCTCGGCGA CCTTGGCTTT ACGCTTGCTC  
1301 GTCGCTACTT CCTCAACCAC TACACCGGCG GCACCAAGTA CTCATTCCCTC  
10 1351 CTGAAGCAGC TCCTGGGCTT GCCGGTGCTC GGAACGTTCC ACTCCAACGA  
1401 CATTGTCTTC CAGGACTACT TGTGCGGAG CGGCTCGCTC ATCTACAACA  
1451 ACGCGTTCAT TCGTTTTGCC ACGGACTTGG ACCCCAACAC CGCGGGGTTG  
1501 TTGGTGAAGT GGCCCGAGTA CACCAGCAGC CTGCAGCTGG GCAACAACCT  
1551 GATGATGATC AACGCCTTGG GCTTGTACAC CGGCAAGGAC AACTTCCGCA  
15 1601 CCGCCGGCTA CGACGCGTTG TTCTCCAACC CGCCGCTGTT CTTTGTGTAA

10/ - Procédé selon la revendication 2, dans lequel la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant le gène de lipase et le promoteur associé, et en  
5 introduisant cette cassette d'expression dans le génome de cellules somatiques de la plante par un transfert à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, ou par électroporation, ou par biolistique, ou par microinjection.

11/ - Procédé selon la revendication 2,  
10 dans lequel la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant le gène de lipase et le promoteur associé, et en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de microspores de la plante par électroporation ou  
15 biolistique.

12/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, dans lequel l'incubation pour engendrer l'hydrolyse enzymatique est réalisée à une température comprise entre 20° C et 60° C.

20 13/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel l'extraction des acides gras issus de l'hydrolyse est réalisée par une extraction liquide/liquide utilisant un solvant apolaire.

14/ - Procédé selon l'une des  
25 revendications 1 à 12, dans lequel les acides gras issus de l'hydrolyse sont méthylés in situ par mise en contact avec du méthanol en catalyse acide sous ultrasons en vue de les transformer en esters méthyliques, ces derniers étant extraits par une extraction liquide/liquide utilisant un  
30 solvant apolaire.

15/ - Plante oléagineuse ou semence de plante oléagineuse, d'une variété non protégée par un certificat d'obtention végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend dans son génome une cassette d'expression  
35 possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène dans des compartiments cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents des compartiments lipidiques de la

plante ou de la semence.

16/ - Plante ou semence selon la revendication 15, dans laquelle le promoteur associé au gène de lipase est un promoteur à expression cellulaire ou  
5 tissulaire spécifique.

17/ - Plante ou semence selon la revendication 15, dans laquelle le gène de lipase est muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents des  
10 compartiments d'accumulation des lipides, le promoteur étant un promoteur constitutif.

18/ - Plante oléagineuse ou semence de plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, caractérisée en ce qu'elle  
15 comprend dans son génome une cassette d'expression possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène sur induction exogène, en particulier par un stress.

1/1

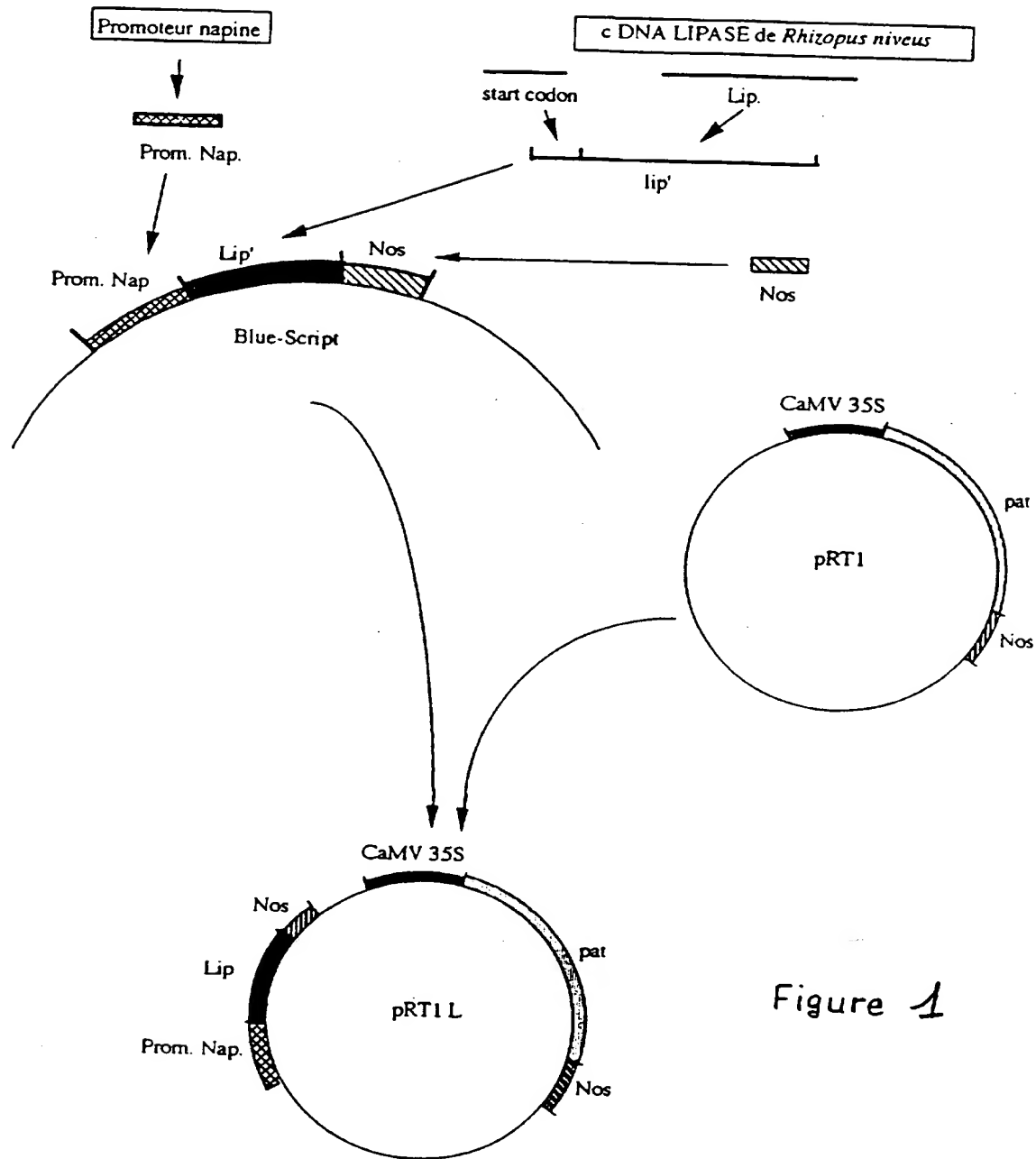


Figure 1